

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126075

(43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl.

C12N 9/04
// (C12N 9/04
C12R 1:07)

(21)Application number : 02-249775

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 18.09.1990

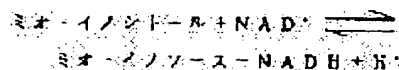
(72)Inventor : TAKAHASHI MAMORU
MATSUURA KAZUO

(54) MYO-INOSITOL DEHYDROGENASE AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain myo-inositol dehydrogenase having excellent heat-stability, etc., and exhibiting specific substrate specificity, enzymatic action, etc., at a low cost by culturing a microbial strain belonging to genus Bacillus and capable of producing myo-inositol dehydrogenase in a medium and separating the subject enzyme from the cultured product.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to genus Bacillus and capable of producing myo-inositol dehydrogenase (e.g. Bacillus sp. No.3, FERM BP-3013) is cultured in a medium and myo-inositol dehydrogenase is separated from the cultured product. The enzyme has substrate specificity to myo-inositol and catalyzes the reaction to produce myo-inosose, NADH and H⁺ from myo-inositol and NAD⁺. The residual activity of the enzyme is ≥95% at 60° C and a reagent for determining myo-inositol in high accuracy can be produced by using the enzyme.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平4-126075

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)4月27日

C 12 N 9/04
// (C 12 N 9/04
C 12 R 1:07)

Z 7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全12頁)

⑭ 発明の名称 ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法

⑮ 特 願 平2-249775

⑯ 出 願 平2(1990)9月18日

⑰ 発 明 者 高 橋 守 静岡県駿東郡清水町柿田684-1

⑱ 発 明 者 松 浦 一 男 静岡県田方郡菰山町四日市1005-5

⑲ 出 願 人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

⑳ 代 理 人 弁理士 小林 和憲 外1名

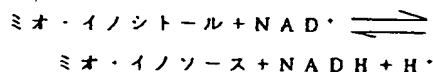
明 細 書

1. 発明の名称

ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその
製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 基質特異性として少なくともミオ・イノシトールに基質特異性を有し、酵素作用として下記式



に示すように、少なくともミオ・イノシトールおよびNAD⁺からミオ・イノソースおよびNADH + H⁺を生成する反応を触媒し、60℃における残存活性が95%以上である特徴を有するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

(2) 少なくとも下記の理化学的性状を有する請求項1記載のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

① 分子量 : 130,000 ± 15,000
(TSKゲルC3000SWによる濾過法)

② 等電点 : pH 4.5 ± 0.5

③ K_m値 :ミオ・イノシトールに対するK_m値

: 0.64 mM

NAD⁺に対するK_m値

: 0.004 mM

④ 至適pH : pH 9.5付近

⑤ pH安定性

: pH 6.5 ~ 9.0で80%以上の
残存活性を有する。

(3) バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌を培地に培養し、得られた培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法。

(4) バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が、バチルス・エスピーNo. 3〔微工研条寄第3013号(FERM BP-3013)〕である請求項3記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規かつ有用なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法に関する。さらに詳しくは、臨床生化学検査、食品検査などにおけるミオ・イノシトールの測定に利用されるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法に関する。

〔従来の技術〕

ミオ・イノシトールはイノシトールの9つの異性体の1つで、極めて安定した環状アルコールである。人の場合、ミオ・イノシトールは食事により1日約1g、腎臓における生合成により約2gが供給され、細胞への取り込みと腎臓における排泄・再吸収および酸化により血しょうレベルがほぼ一定になるように調節されている。そのため腎機能障害において血しょうミオ・イノシトールレベルの著明な増加が見られる（臨床科学24巻、11号、1448-1455頁、露門信雄）。このようにミオ・イノシトールを測定することによって腎機能のモニタリングができる。

従来、ミオ・イノシトールはガスクロマトグラフ

イー、高速液体クロマトグラフィー等で測定されており、臨床生化学ではミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを用いてミオ・イノシトールを測定する例は知られていなかった。

公知のミオ・イノシトールに基質特異性を有し、少なくともミオ・イノシトールおよび NAD^+ からミオ・イノソースおよび $\text{NADH} + \text{H}^+$ を生成する反応を触媒する酵素生産菌として知られている Aerobacter aerogenes (Methods in Enzymology 36, 326 (1962) (V)) の生産する酵素は至適pHが9.0、ミオ・イノシトールに対する K_m 値は $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ であり、 NAD^+ に対する K_m 値は $3.3 \times 10^{-4} \text{M}$ であると記載されている。（酵素ハンドブック、朝倉書店発行、p.6）。また、公知の本酵素生産菌として知られている、Klebsiella pneumoniae、Serratia marcescens（酵素ハンドブック、p.6）の2種は標準微生物学第2版（医学書院、p.209-212）によると肺炎あるいは日和

見感染起因菌として化学療法剤、抗生物質に抵抗性を有する雑治性感染菌として知られており、工業的規模で培養することは避けなければならず、現状ではこれら生産菌による当該酵素の性状についての報告はない。更に、従来公知の Cryptococcus melibiosum (Biochem. Biophys. Acta, 293, 295-303 (1973)) の生産する酵素のミオ・イノシトールに対する K_m 値は $5.1 \times 10^{-3} \text{M}$ であり、 NAD^+ に対する K_m 値は $6.9 \times 10^{-3} \text{M}$ であると記載されている。（酵素ハンドブック、p.6）。その他、本酵素は動物の器官として牛の脳（Biochem. Biophys. Res. Commun., 68:1133-1138 (1976)）に存在することが知られているが、酵素を分離するために常に新鮮な脳を入手することは非常に困難なことである上に経済的でなく、また分子量は74,000であると記載されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

このように公知の酵素はその生産菌 (Aerob

acter、Klebsiella、Serratia) が感染菌であったり、Cryptococcus melibiosum 由来の酵素のようにミオ・イノシトールおよび NAD^+ に対する K_m 値が高いために十分な反応速度が得られなかったり、牛の脳のように新鮮な原料を常に多量に入手することが困難であった。

〔課題を解決するための手段〕

そこで、本発明者らは、ミオ・イノシトールを測定する目的で、危険性のない、培養活性の高い、基質であるミオ・イノシトールと NAD^+ に対する K_m 値のできるだけ低い、安定で精製の簡単な酵素を生産する菌株を広く自然界よりスクリーニングしたところ、静岡県賀茂郡東伊豆町熱川の温泉近くの土壌より分離した Bacillus sp No. 3 菌株が目的とする良好な性質を有する新規なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを産生することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、pH8.5において測定したミオ・イノシトールと NAD^+ に対する K_m 値がそれ

それ0.64 mM、0.004 mMと非常に低い、反応性の高い性質を有し、かつほぼ60℃の緩衝液中で約15分間処理した後の活性が、処理前の活性の95%以上の値を保持している優れた熱安定性を有している新規なミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを提供するものである。また、本発明は、バチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌を培地に培養し、得られた培養物からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法を提供するものである。

ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌はバチルス属に属するが、例えば本発明者らが分離したNo. 3菌株は、本発明に最も有効に使用される菌株の一例であって、本菌株の菌学的性質を示すと次の通りである。

尚、本菌株の同定に当たっては、同定実験は医学細菌同定の手引き(第2版)、Microbiological Methods(3巻)に準じて行い、実験結果をBergey's Manual

of Systematic Bacteriology Vol. 1(1984)、2(1986)など対比して同定を行った。

(a) 形態的特徴

端の丸いまっすぐまたはやや曲がった桿状細菌で大きさは0.5~0.7×1.5~3.5 μmで周毛で運動する。端または垂端に0.8×1.0~2.0 μmの橢円~卵形の芽胞を形成し、芽胞によって菌体は膨張する。多形性なし。

(b) 各培地における生育状態

各種培地上で、1~2日、50~52℃で培養し、観察した所見は次の通りである。

① 普通寒天平板培地

円形で丘状(convex)の集落を形成する。表面は滑らかで縁は丸い。黄土色~淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

② 普通寒天斜面培地

線状に良好に生育する。淡黄土~黄土色を呈する。可溶性色素は産生しない。

③ 液体培地(ペプトン水)

生育良好で一様に混濁する。

④ リトモスミルク培地

4~5日後、弱酸性になる。

DNAのGCモル% : 41.9モル%
(HPLC法)

主たるイソプレノイドキノン: MK-7

(c) 生理的、生化学的性質(+; 陽性、(-); 弱陽性、-; 陰性、NT; 未実験)

グラム染色	+
KOH反応	-
カプセル形成	-
抗酸性染色	-
OFテスト (Hugh-Leifson)	NT
OFテスト (N源にNH ₄ H ₂ PO ₄)	F
好気での生育	+
嫌気での生育	+
生育温度 70℃	-
60℃	+

37℃	+
30℃	-
食塩耐性 0%	+
3%	+
5%	-
生育pH 5.6	-
6.2	+
9.0	+
ゼラチンの分解	-
澱粉の分解	(+)
カゼインの分解	-
エスクリンの分解	+
チロシンの分解	-
アルギニンの分解	-
セルロースの分解	-
カタラーゼ産生	+
オキシダーゼ産生	+
レシチナーゼ産生	-
ウレアーゼ産生(SSR)	-
ウレアーゼ産生(Chris)	-

インドール産生	-	マロン酸塩	-
硫化水素産生 (酢酸鉛紙で検出)	-	プロピオン酸塩	+
アセトイン産生 (K_2HPO_4)	-	グルコン酸塩	-
アセトイン産生 ($NaCl$)	-	コハク酸塩	+
MRテスト	-	グルコースよりガスの産生	-
硝酸塩還元テスト (ガス産生)	-	各種糖類より酸の産生	
(NO_2^- の検出)	-	アドニトール	-
(NO_3^- の検出)	+	L (+) アラビノース	-
シモンズ培地での利用性		セロビオース	+
クエン酸塩	-	ズルシトール	-
リンゴ酸塩	-	メソ・エリスリトール	-
マレイン酸塩	-	フラクトース	+
マロン酸塩	-	フコース	+
プロピオン酸塩	-	ガラクトース	+
グルコン酸塩	-	グルコース	+
コハク酸塩	-	グリセリン	+
クリステンゼン培地での利用性		イノシトール	+
クエン酸塩	+	イヌリン	+
リンゴ酸塩	-	ラクトース	+
マレイン酸塩	-	マルトース	+

マンニトール	+
マンノース	+
メレジトース	-
メリビオース	+
ラフィノース	-
ラムノース	+
D-リボース	+
サリシン	+
L-ソルボース	-
ソルビトール	-
澱粉	+
サッカロース	+
トレハロース	+
キシロース	-

以上の通り、本菌株の主性状は、グラム陽性の桿状細菌で、大きさは $0.5 \sim 0.7 \times 1.5 \sim 3.5 \mu m$ 、周毛で運動、芽胞形成、多形性なし、グルコースを酵素的に分解し、酸を産生する。カタラーゼ・オキシダーゼ産生。高温性の通性嫌気性であり、これらのグラム陽性桿菌で芽胞を形成し、好気で

生育する特徴から、バチルス属に属すると判断された。

そこで、本菌株がバチルス属のどの種に属するか否かを同定した。即ち、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2によれば、高温 ($50^\circ C$) で生育する菌種はバチルス アシドカルダリウス (*B. acidocaldarius*)、バチルス サブチリス (*B. subtilis*)、バチルス バジウス (*B.adius*)、バチルス ブレビス (*B. brevis*)、バチルス コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス パントセンチカス (*B. pantothenticus*)、バチルス シェゲリ (*B. schegellii*)、バチルス ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) の9菌種が記載されている。その内で、嫌気下で生育する菌種はバチルス *B. coagulans* と *B. licheniformis* の2菌種のみ

である。即ち、*B. coagulans* (以下、「C」と略記することがある) および *B. licheniformis* (以下、「L」と略記することがある) と本菌とを対比した結果は、次の通りである。

尚、C、Lおよび本菌で示される「+」は陽性、「(+)」は弱陽性、「-」は陰性、「d」は菌株によって異なる、NDはデータなしであることを示す。

	C	L	本菌
オキシダーゼ産生	-	d	+
芽胞による膨張	d	-	+
嫌気生育	+	+	+
アセトイン産生	+	+	-
グルコース (酸)	+	+	+
L-アラビノース (酸)	+	+	+
キシロース	d	+	-
マンニット (酸)	d	+	+
カゼイン分解	d	+	-
ゲラチン分解	d	+	-

以上対比した結果によれば、本菌株No. 3の諸性状は *Bacillus coagulans* に近いと考えられるが、アセトイン産生能、DNAのGCモル%、また上記対比表には載せていないが、リトモスミルク培地での反応も違っている。

よって、本菌株を公知のものと区別するため、バチルス・エスピーNo. 3 (*Bacillus* sp. No. 3) と命名し、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研条寄第3013号 (FERM BP-3013) として寄託した。

本発明においては、先ずバチルス属に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が適当な培地に培養される。

上記のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌としては、前述のバチルス・エスピーNo. 3が挙げられるが、細菌の一般的性状として菌学上の性質は変異し得るものであるから、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射、放射線照射または変異誘導剤、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネートなどを用

デンプン分解	-	+	(+)
クエン酸塩利用	+	+	-
プロピオン酸塩利用	d	+	-
チロシン分解	-	+	-
LV反応	-	+	-
インドール産生	-	+	-
食塩耐性 2%	+	+	+
5%	-	+	-
7%	-	+	-
10%	-	ND	-
生育温度 40℃	+	+	+
50℃	+	+	+
55℃	+	+	+
60℃	ND	ND	+
70℃	-	-	-
硝酸塩還元	d	+	-
DNAのGCモル%	44.5	46.4	41.9
(Type)	(Type)	(Type)	(Type)
	44.3	42.9	
	~50.3	~49.9	

いる人工的変異手段により変異し得る人工変異株は勿論、自然変異株も含め、バチルス属に属し、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを生産する能力を有する菌株は、すべて本発明に使用することができる。

上記の培養は、細菌の培養に一般に用いられる条件によって行うことができるが、本菌株の培養にあたっては、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼがミオ・イノシトールによって誘導的に生成される誘導酵素であることから、例えばミオ・イノシトールを0.5~5%含む培地で培養することがミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの生産性を100~300倍程度良好とするので好ましい。

培地としては、ミオ・イノシトールを添加する以外に微生物が同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、さらには必要に応じ、無機塩などを含有させた栄養培地が使用される。

同化し得る炭素源としては、グルコース、フラクトース、サッカロースなどが単独または組み合わせて用いられる。消化し得る窒素源としては、例えば

ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが単独または組み合わせて用いられる。その他必要に応じてリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、その他、鉄、マンガンなどの種々の重金屬塩などが使用される。上記以外に公知の同化し得る炭素源、消化し得る窒素源が使用できることはいうまでもない。

培養は、通常振とうまたは通気攪拌培養などの好氣的条件下で行うのがよく、工業的には深部通気攪拌培養が好ましい。培養温度はミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が発育し、本酵素を生産する範囲内で適宜変更し得るが、通常は 40～60℃、特に 50℃付近が好ましい。培養時間は培養条件によって異なるが、本酵素が最高力価に達する時期を見計らって適当な時期に培養すればよいが、通常は 1～2 日間程度である。

これらの培地組成、培地の液性、培養温度、攪拌速度、通気性などの培養条件は使用する菌株の種類や外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節、選択されることは言うまでもない。

よく、その精製手段としては、目的とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの性質を利用した手段を用いればよく、例えば上記の沈澱物を水または緩衝液に溶解した後、必要に応じて半透膜にて透析し、さらに DEAE-セルロース、DEAE-セファセル、DEAE-セファロース、DEAE-セファデックス、Q-セファロース（ファルマシア製）、DEAE-トヨパール（東洋曹達社製）ハイドロキシルアバタイト等のイオン交換樹脂や、オクチルセファロース、フェニルセファロース（ファルマシア社製）等の疎水クロマト樹脂や、その他のアフィニティークロマト樹脂が使用される。また、セファデックス G-100、セファクリル S-200 等のゲル濾過剤による分子篩クロマトや、さらに必要に応じて透析膜を用いて脱塩すればよい。その後、必要に応じて糖類、例えばマンニトール、サッカロース、ソルビトール等、アミノ酸、例えばグルタミン酸、グリシン等、ペプチドまたは蛋白質として牛血清アルブミン等の安定剤の 0.05～10% 程度を添加し、凍結乾燥等の処理により精製されたミ

液体培養において発泡があるときは、シリコン油、植物油などの消泡剤が適宜使用される。

このようにして得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは、主として菌体内に含有されるので、得られた培養物から濾過または遠心分離等の手段により集菌し、この菌体を超音波処理、フレンチプレス処理、ガラスビーズ処理、凍結破砕処理等の機械的破壊手段やリゾチーム等の酵素的破壊手段等の種々の菌体処理手段を適宜組み合わせて、粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液が得られる。

次いで、この粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液から公知の蛋白質、酵素等の単離、精製手段を用いることによりさらに精製されたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを得ることができる。例えば粗製のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ含有液に、硫酸、硫酸ナトリウム等を添加する塩析沈澱法により本酵素を回収すればよい。さらにこの沈澱物は、分子篩、各種の樹脂を用いたクロマトグラフィー法、電気泳動法あるいは超遠心分析法を適宜組み合わせ用いて、必要に応じて精製すれば

ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの粉体を得ることができる。

以上の如くして得られたミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの性状は以下の通りである。

(1) 基質特異性

ミオ・イノシトール	100%
グルコース	0
フルクトース	0
ガラクトース	0
ソルビトール	0
マンノース	0
マルトース	0
サッカロース	0
ラクトース	0

(2) 酵素作用

下記式に示すように、少なくともミオ・イノシトールおよび NAD⁺ よりミオ・イノソースおよび NADH を生成する反応を触媒する。



* (2, 4, 6/3, 5-ペンタヒドロキシシクロヘキサノン)

(3) 分子量

130,000 ± 15,000

トソー社製TSKゲルG3000SW (0.75 × 60 cm) による値、溶出液: 0.2 M NaCl 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、標準品はオリエンタル酵母社製の次の分子量マーカーを使用。

M. W.	12,400	シクロロム C
M. W.	32,000	アデニレイトキナーゼ
M. W.	67,000	牛血清アルブミン
M. W.	142,000	ラクテートデヒドロゲナーゼ
M. W.	290,000	グルタマートデヒドロゲナーゼ

(4) 等電点

pH 4.5 ± 0.5

キャリアアンフォライトを用いる焦点電気泳動法

pH 9.0 ~ 10.0、-■-) の各緩衝液を用いて測定した活性の相対値の結果は第4図に示す通りであって、pH 9.5 付近で最大の活性を示す。

(7) pH 安定性

本酵素 (1 u/ml) を 40 mM の酢酸緩衝液 (pH 4.5 ~ 6.0、-▲-)、リン酸緩衝液 (pH 6.0 ~ 8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0 ~ 9.5、-□-) およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.0 ~ 10.0、-■-) の各緩衝液で調製し、50℃で15分間加熱処理した後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第3図に示す通りであって、pH 6.5 ~ 9.0 の範囲で80%以上の活性を保持している。

(8) 熱安定性

本酵素液 (1 u/ml) を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7) で調製し、15分間加熱処理後、その残存活性を後記の酵素活性測定法に従って測定した結果は、第1図に示される通りであって、60℃までは残存活性として95%以上を有する安定なも

により4℃、700 V の定電圧で40時間通電した後、分画し、各画分の酵素活性を測定した。

(5) Km 値

100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)、
5 U ジアフォラーゼ (東洋醸造社製)、
1 mM NAD⁺ (オリエンタル酵母社製)、
0.025% NTB (和光純薬工業社製)

を含む反応液中でミオ・イノシトールの濃度を変化させて、ミオ・イノシトールに対する Km 値を測定した結果は、0.64 mM の値を示した。

一方、前記反応液中で NAD⁺ の代わりに 15 mM のミオ・イノシトールを添加し、NAD⁺ の濃度を変化させて NAD⁺ に対する Km 値を測定した結果は、0.004 mM の値を示した。

(6) 至適 pH

後記の酵素活性測定法に従い、反応液中の 100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に代えて 100 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.5 ~ 8.0、-○-)、トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0 ~ 9.0、-□-) およびグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (

のであつた。

(9) 至適温度

100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) を用い、後記の酵素活性測定法に従い、35、40、45、50、55、60 および 65℃ の各温度で 10 分間反応後、0.1 N 塩酸 2 ml で反応を停止し、波長 550 nm で吸光度を測定した相対値の結果は、第2図に示す通りであって、60℃付近で最大の活性を有している。

00 ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ活性測定法

① 反応液組成

100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)、
15 mM ミオイノシトール (和光純薬社製)
1 mM NAD⁺ (オリエンタル酵母社製)
5 U ジアフォラーゼ (東洋醸造社製)、
0.025% NBT (和光純薬工業社製)、

② 酵素活性測定

上記の反応液 1 ml を小試験管に入れ、37℃で5分間インキュベートした後に、適当に希釈した酵

素液0.02mℓを添加して攪拌し、反応を開始する。正確に10分間反応の後に、0.1N塩酸2.0mℓを添加して攪拌し、反応を停止して、 A_{550nm} を測定して吸光度 A_0 を求める。上記反応液よりミオ・イノシトールを除いた反応液を用いて同様の測定を行い、その吸光度 A_0 を求める。

③計算式

$$U/m\ell = \frac{(A_1 - A_0)}{18.3} \times \frac{1}{10} \times \frac{3.02}{0.02} \times X$$

18.3 : 分子吸光係数 $cm^2 / \mu mol$
X : 希釈倍数

(発明の効果)

本発明のパチルス属に属するパチルス・エスピー・N_o. 3由来の新規な性状を有するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼは60℃で残存活性として95%以上有する熱安定性に優れている新規な酵素であり、かつ、基質のミオ・イノシトールおよび補酵素のNAD⁺に対する K_m 値が非常に低いために優れた反応性を有していることから、本酵素を利用し

た極めて優れたミオ・イノシトール測定用試薬を提供できる。また本発明の酵素は分離、精製中における失活も少なく、精製も容易であるので、ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製法として有利な製造法を提供できる。

次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これにより本発明を限定するものではない。

実施例 1

パチルス・エスピー・N_o. 3の培養

酵母エキス(極東製薬社製)2%、ペプトン(極東製薬社製)2%、リン酸2カリウム(和光純薬社製)0.2%、塩化カルシウム(和光純薬社製)0.02%、硫酸マグネシウム(和光純薬社製)0.05%、ミオ・イノシトール(和光純薬社製)2%、pH7.3を含む液体培地100mℓを500mℓ容三角フラスコに分注し、120℃で20分間加熱滅菌した後、これにパチルス・エスピー・N_o. 3の1白金耳を接種し、50℃で120r.p.m.の振とう培養器で30時間培養して種母85mℓ(酵素活性1.2u/mℓ)を得た。

一方、上記と同様の培地組成にて消泡剤としてデイスフォーム442(日本油脂)を0.1%添加した液体培地20Lを30L容ジャーフェメンターに仕込み、加熱滅菌した後上記の種母85mℓを移植し、培養温度50℃、通気量20L/分、内圧0.4kg/cm²、攪拌速度150r.p.m.で24時間通気培養し、培養物18.0L(酵素活性1.8u/mℓ)を得た。

実施例 2

実施例1で得た培養物を遠心分離で集菌し、これに0.1%リゾチーム(エーザイ社製)を含む20mMリン酸緩衝液(pH7.5)5Lを加え、37℃で1時間インキュベイトした後、遠心分離して沈澱物を除去し、上清4.5L(6u/mℓ)を得た。この上清にアセトンを1.8L添加攪拌し、生じた沈澱物を遠心分離して集め、これを20mMリン酸緩衝液で溶解し1Lの粗酵素液(24.2u/mℓ)を得た。この溶液に固形硫酸を200g溶解し、生じた沈澱物を遠心分離して除去し、得られた上清に

再び固形硫酸を250g溶解した。この処理液を遠心分離して得られた沈澱物を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で溶解し、500mℓの酵素液(36.3u/mℓ)を得た。この酵素液を透析膜(三光純薬社製)を用いて20Lの20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に対して一晚透析し、得られた酵素液を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で緩衝化したDEAE-セファロースCL-6B(ファルマシア)250mℓのカラムに通し、0.1M KClを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.5)1Lを流した後、次いで0.3M KClを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で溶出し、酵素液350mℓ(35.2u/mℓ)を得た。得られた酵素液を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)20Lに対して一晚透析した。こうして得られた酵素液に牛血清アルブミン(シグマ社製)を0.2g溶解した後に凍結乾燥して、凍結乾燥標品1.1g(10.6u/mg)を得た。

参考例 1

公知の生産菌によるミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造および性質の比較:

Klebsiella pneumoniae IFO 12019、Aerobacter aerogenes IFO 12979およびSerratia marcescens ATCC 13880の培養: ペプトン(極東製薬社製); 5g/ℓ、肉エキス(Difco.); 5g/ℓ、塩化ナトリウム(和光純薬社製); 5g/ℓ、ミオ・イノシトール(和光純薬社製); 10g/ℓ; pH 7.0を含む液体培地100mℓを500mℓ容三角フラスコに分注し、120℃、20分間加熱滅菌した後に、上記3株をそれぞれ1白金耳接種し、37℃、100r.p.m.の振とう培養器で48時間培養した後に、遠心分離で集菌し、20mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.0に懸濁し超音波破砕器(久保田製作所製)を用いて180W、10分間ソニケーションした後に15000r.p.m.、15分間遠心分離して上清を得た。それぞれの上清の活性を前記ミオ・

イノシトールデヒドロゲナーゼ活性測定法で測定した。

	液量(mℓ)	活性(u/mℓ)
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	7.0	0.12
<u>Aerobacter aerogenes</u>	6.8	0.15
<u>Serratia marcescens</u>	7.2	0.08

それぞれの酵素液1mℓを試験管に分注し、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃で15分間加熱処理後、その残存活性を活性測定法にしたがって測定した結果を第5図に示す。

Klebsiella: -○-

Aerobacter: -△-

Serratia: -□-

参考例 2

Cryptococcus melibiosus IFO 1871株を用いてBiochem. Biophys. Acta, 293, 295-303 (1973)記載の培養条件で培養した。ミオ・イノシトール(和光純薬社製); 0.5%、Bacto-peptone(Difco.); 1%、Bacto-yeast extract(Difco.); 0.5%、pH 6.2を含む液体培地100mℓを500mℓ容三角フラスコに分注し、120℃、20分間加熱滅菌した後に上記菌株を1白金耳接種し、25℃、100r.p.m.の振とう培養器で48時間培養した後に遠心分離で集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、超音波破砕器(久保田製作所製)を用いて180W、10分間ソニケーションの後に15000r.p.m.、15分間遠心分離して上清(10mℓ、21u/mℓ)を得た。

参考例 3

牛の脳を用いてBiochemical and Biophysical Research Communications, 68, No. 4, 1133-1138 (1976)記載の方法で牛の脳100gよりホモジネイト、DEAE-cellulose、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーを用いて精製酵素液(50mℓ)を得た。しかし、文献中にも記載されているように牛の脳の酵素はミオ・イノソースとNADHよりミオ・イノシトールとNAD⁺を生成する方向に活性が大きく傾いており、事実本精製酵素でもミオ・イノソースからミオ・イノシトールの逆方向への活性は0.045u/mℓ認められたが、正方向の活性はほとんど認められなかった。

ミオ・イノソースとNADHからミオ・イノシトールとNAD⁺を生成する活性の活性測定法

反応液組成

100mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.5)
10mM ミオ・イノソース(シグマ社製)

0.3 mM NADH

活性測定法

上記反応液 1 ml を石英セルに分注し、37℃ で 2 分間インキュベートした後に酵素液（前記参考例 2 および 3）0.05 ml を添加し、NADH の A_{340nm} における減少を測定する。

$$U / ml = \frac{-A_{340nm} / \text{分} \times 1.05}{6.22 \times 0.05}$$

6.22 : 分子吸光度係数 $\mu\text{mol} / \text{cm}^2$

それぞれの酵素 1 ml を試験管に分注し、35℃、40℃、45℃、50℃ で 15 分間加熱処理後、その残存活性を参考例における *Cryptococcus* 由来の酵素については 100 の活性測定法に従って測定し、牛の脳由来の酵素については前述の活性測定法に従って測定した結果は第 5 図に示した。

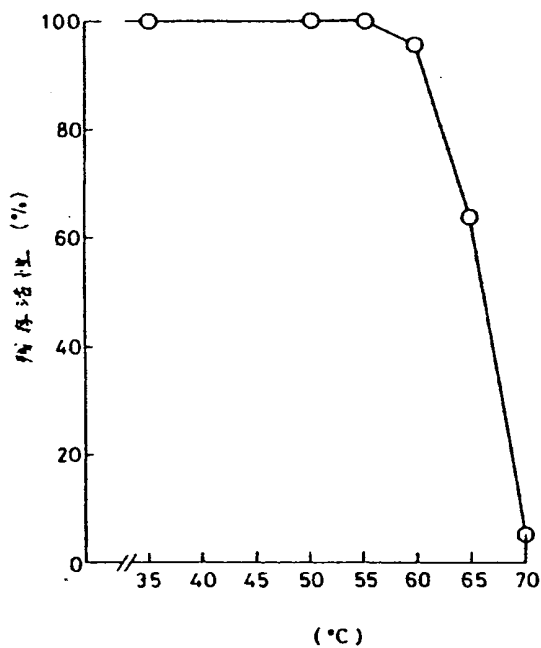
Cryptococcus melibiosus m ; -●-

牛の脳 ; -■-

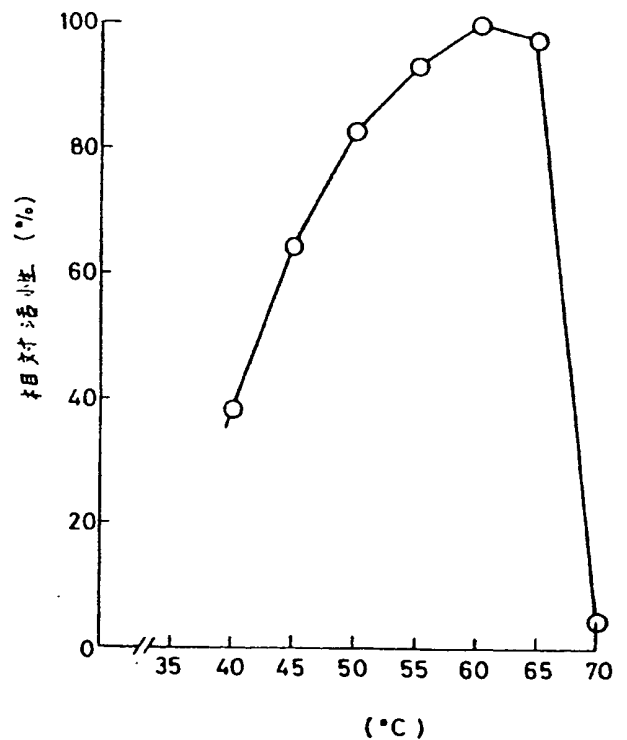
4. 図面の簡単説明

第 1 図は本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す曲線、第 2 図はその至適温度を示す曲線、第 3 図はその pH 安定性を示す曲線、第 4 図はその至適 pH を示す曲線、第 5 図は本発明のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性を示す曲線である。

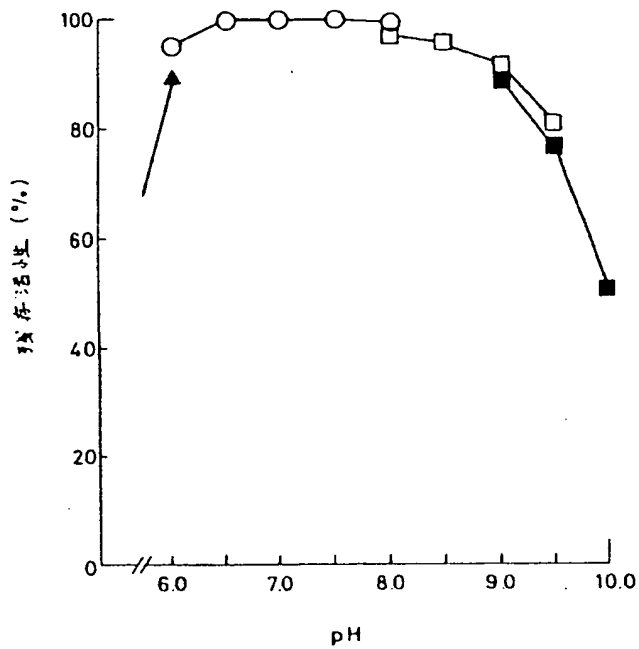
第 1 図



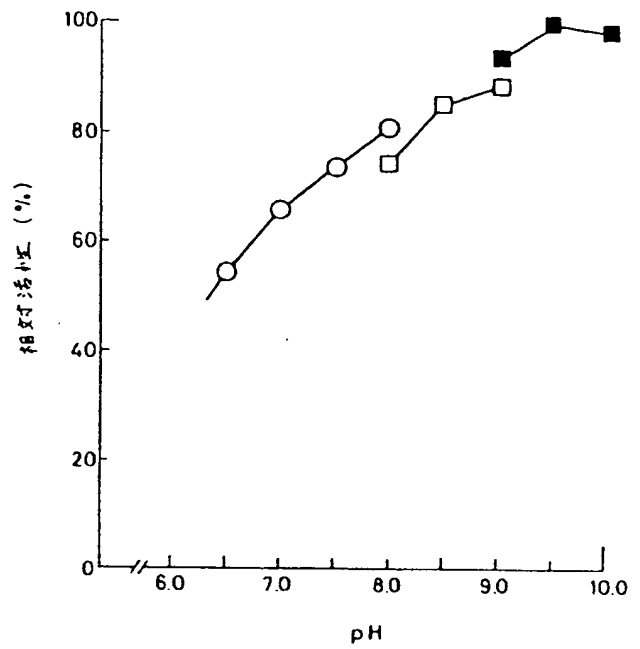
第 2 図



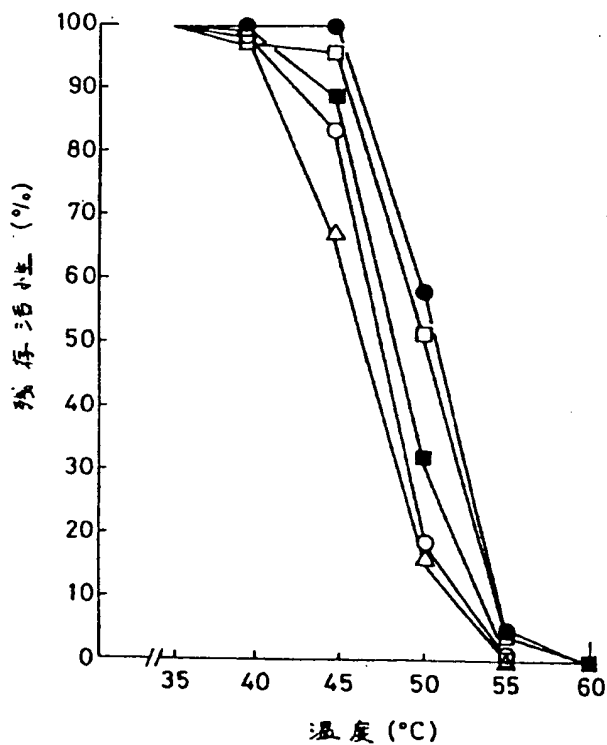
第 3 図



第 4 図



第 5 図



手続補正書

平成 3 年 1 2 月 5 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示
平成 2 年 特許願 第 2 4 9 7 7 5 号
2. 発明の名称
ミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼおよびその製造法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住所 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1
名称 東洋醸造株式会社
4. 代理人 〒1 7 0
東京都豊島区北大塚 2 - 2 5 - 1
太陽生命大塚ビル 3 階
電話 (3 9 1 7) 1 9 1 7
(7 5 2 8) 弁理士 小 林 和 憲
5. 補正命令の日付
自発
6. 補正の対象
明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

- (1)、明細書第 2 4 ページ上から 7 行目の後に
「0. 1 %牛血清アルブミン(シグマ社製)」を
挿入する。
- (2)、明細書第 2 5 ページ下から 5 行目「トリス
塩酸」とあるを「リン酸」と補正する。
- (3)、明細書第 2 6 ページ下から 4 行目の後に
「0. 1 %牛血清アルブミン(シグマ社製)」を
挿入する。

以上

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成11年(1999)1月19日

【公開番号】特開平4-126075

【公開日】平成4年(1992)4月27日

【年通号数】公開特許公報4-1261

【出願番号】特願平2-249775

【国際特許分類第6版】

C12N 9/04

// (C12N 9/04

C12R 1:07)

【FI】

C12N 9/04 Z

手続補正書

平成9年8月26日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成 2年 特許願 第241775号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏名 旭化成工業株式会社

3. 代理人

東京都豊島区北込2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(3917)1917

(7528) 弁護士 小林 和彦

(外1名)

4. 補正命令の日付

自発

5. 補正対象書類名

(1) 明細書

(2) 図面

6. 補正対象項目名

(1) 明細書の特許請求の範囲の欄

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

(3) 明細書の図面の簡単な説明の欄

(4) 図面の第6図

7. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

(2) 明細書第18ページ上ら11行「デオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ」とあるを「デオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ」に補正する。

(3) 同ページ中上から12行「シトールデヒドロゲナーゼ」とあるを「シト

ールデヒドロゲナーゼ」に補正する。

(4) 明細書第18ページ上ら11行「デヒドロゲナーゼ」とあるを「デヒドロゲナーゼ」に補正する。

(5) 明細書第20ページ上ら10行「デオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ」とあるを「デオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ」に補正する。

(8) 明細書第35ページ下から1行「午の部：一四一」の後に改行して次文を挿入する。

【参考例 4

The Journal of Biological Chemistry, 254 (1980), p 7890, 1979の文献に記載されているように公知のバチルス サブチリス(Bacillus subtilis)由来のイノシトールデヒドロゲナーゼの41℃における熱安定性の実験結果は、第6図に示される通りである。第6図において、一□一：リン酸緩衝液(pH 6.5)、一◆一：トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)、一■一：リン酸緩衝液(pH 7.5)、一○一：トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)、一△一：リン酸緩衝液(pH 8.0)、一◇一：トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)をそれぞれ示す。この実験結果から明らかなように41℃において、バチルス サブチリス由来の酵素はリン酸緩衝液およびトリス-塩酸緩衝液において不安定であることが認められる。同様の実験を60℃まで熱安定性に優れた本発明の酵素を用いて行ったところ、前記いずれの条件においても100%の活性を保持し、文献酵素と比べて非常に安定な酵素、すなわち耐熱性酵素であることが認められた。」

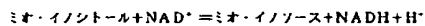
(7) 明細書第36ページ上から7行「示す曲線である。」とあるを「示す曲線であり、第6図は公知のバチルス サブチリス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼの41℃における熱安定性を示す曲線である。」に補正する。

(8) 明細書に添付の図面に第6図を追加する。



修正後の特許請求の範囲

(1) 基質特異性として少なくともミオ・イノシトールに基質特異性を有し、酵素作用として下記式



に示すように少なくともミオ・イノシトールおよび NAD^+ からミオ・イノソースおよび $\text{NADH} + \text{H}^+$ を生成する反応を触媒するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼにおいて、

60度における残存活性が95%以上であること、及びミオ・イノシトールに対する K_m 値が約0.84mMであること、並びに NAD^+ に対する K_m 値が約0.004mMであること、

とを有することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

(2) 少なくとも下記の特異性性状を有する請求項1記載のミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ。

①分子重 : 130,000 \pm 15,000

(TSKゲルG3000SWによる測定法)

②等電点 : pI 4.5 \pm 0.5

③至適pH : pH 9.5付近

④pH安定性 : pH 9.5 \sim 9.0で90%以上の残存活性を有する。

(3) パチルス菌に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌を培養に培養し、得られた培養液からミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とするミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼの製造法。

(4) パチルス菌に属するミオ・イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌が、パチルス・エスピーNo. 3 (醸造研究第1013号 (FERM BP-3013)) である請求項3記載の製造法。

以上

第 6 図

